

## 1. La vaccination à ADN, une stratégie prometteuse contre le virus de la fièvre de la vallée du Rift chez le mouton

### a) Induction d'une réponse immunitaire protectrice par un plasmide codant l'eGn du vFVR chez le mouton

Un point fort de notre étude est l'utilisation du modèle ovin. Nous avons pu tester nos candidats vaccins dans des cohortes de moutons de races européennes différentes (Lacaune et Préalpes) et d'âges différents (2 et 12 mois). Ceci nous a permis d'évaluer de façon pertinente leur efficacité chez l'hôte naturel du virus qui peut également être considéré comme un modèle d'intérêt préclinique pour l'Homme. Toutefois, ce modèle présente également des limites, notamment le manque d'outils disponibles pour investiguer des réponses immunitaires, la complexité du modèle pour l'étude des mécanismes impliqués dans la protection qui sera discutée ultérieurement et le coût financier qui conditionne la planification de l'étude (le choix du nombre de groupes, les conditions à tester, les prélèvements à collecter).

Nous avons montré que le plasmide codant l'eGn (peGn) a induit une réponse humorale et a conféré une protection chez les agneaux vaccinés par rapport aux non vaccinés. La fièvre et la virémie étaient significativement diminuées par rapport aux groupes non vaccinés (article 1, Figure 4). Nous avons ainsi validé le potentiel vaccinal de l'eGn en vaccination à ADN chez le mouton et à notre connaissance, notre étude montre pour la première fois la protection médiée par un vaccin à ADN dans l'hôte naturel contre le vFVR (Faburay et al., 2017). Ce vaccin présente l'avantage de pouvoir induire une réponse immunitaire permettant de distinguer des animaux vaccinés des infectés (DIVA) et il est sûr (innocuité, pas de virus réassortant possible).

Etant donné que peGn a conféré la meilleure protection et la plus forte réponse humorale par rapport au plasmide codant l'eGn soit fusionné à un scFv dirigé contre DEC205 (pscDEC-eGn), soit fusionné à un scFv dirigé contre CD11c (pscCD11c-eGn), nous avons fait l'hypothèse que la protection était majoritairement médiée par les anticorps anti-eGn. Pour essayer de répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé des analyses de corrélations à partir des données immunologiques et virologiques chez les animaux vaccinés, avant et après infection. Les analyses ont montré une bonne corrélation entre les anticorps anti-eGn avec la réduction de la virémie et les signes cliniques, mais pas avec la réponse cellulaire IFN $\gamma$ . Toutefois, dans la limite des outils disponibles, nous n'avons pas pu analyser la sécrétion

d'autres cytokines ainsi que l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> qui pourraient avoir un rôle dans cette protection.

Les anticorps anti-eGn induits par nos vaccins à ADN ne neutralisent pas le virus *in vitro*, propriété qui sera discutée ultérieurement. De plus, ils pourraient protéger contre l'infection par le vFVR par la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante (ADCC), par phagocytose ou par la lyse complément-dépendante.

## b) Perspectives

Nos vaccins à ADN ont été administrés par voie intradermique à l'aide d'une seringue à insuline suivie d'une électroporation de surface, à raison de 3 injections à 3 ou 4 semaines d'intervalle sur des animaux anesthésiés. Les injections intradermiques sont plus délicates à réaliser par rapport aux injections intramusculaires et nous avons montré que l'injection intradermique pouvait introduire une variabilité au niveau de l'expression des vecteurs *in vivo* (article 1, Figure 2.E). D'autres systèmes de délivrance portatifs qui sont plus adaptés pour des vaccinations de masse, et qui idéalement permettent d'injecter des plasmides de manière standardisée, pourraient être testés. Une étude récente a montré que l'administration chez des porcs d'un plasmide codant l'hémagglutinine du virus de la grippe délivré d'une part par pression (needle-free jet injector) et d'autre part par injection intradermique suivie d'une électroporation a induit des réponses similaires (Grodland et al., 2016). La technologie d'injection par pression est actuellement testée en combinaison à une vaccination à ADN contre le PRRSV (syndrome dysgénésique respiratoire porcin) chez le porc dans un projet coordonné par notre équipe de l'INRA.

L'injection d'une dose plus élevée de plasmide pourrait permettre de diminuer le nombre de rappels. En effet, chez l'Homme, des doses de plasmide pouvant aller jusqu'à 5mg/injection ont été utilisées en étude clinique (Beckett et al., 2011). Or, dans notre étude, nous avons utilisé 400µg de plasmide vaccinal/injection.

Nous avons montré que peGn a induit une réponse humorale 3 semaines après la dernière immunisation. Il serait intéressant d'évaluer la durée du maintien de cette réponse et la protection à long terme médiée par ce vaccin à ADN.

Le plasmide peGn a conféré une immunité non stérilisante chez les agneaux puisqu'il n'a pas empêché pas la virémie, bien qu'elle était significativement diminuée (~3 log<sub>10</sub>) par rapport

aux agneaux non vaccinés (article 1, Figure 4). La combinaison de plusieurs antigènes pourrait être une alternative pour renforcer la protection. En effet, une étude a montré une protection totale chez des moutons suite à l'injection de protéines eGnGc (Faburay et al., 2016). La co-injection de plasmides codant eGn et Gc pourrait être testée chez les moutons, et plus particulièrement chez des femelles gestantes qui font parties des cibles prioritaires à protéger.

A l'heure actuelle, aucun vaccin commercialisé n'a montré une innocuité et une protection chez les femelles gravides contre les avortements (cf. introduction partie IV.B.1). Par ailleurs, il serait également intéressant d'évaluer le rôle des anticorps maternels anti-Gn et anti-Gc générés lors de l'immunisation dans la protection du nouveau-né, qui, jusqu'à présent, n'a pas été exploré.

## 2. L'efficacité du ciblage des DCs en vaccination à ADN contre le vFVR

L'efficacité du ciblage des DCs via DEC205 et CD11c pour améliorer les réponses immunitaires a été largement documentée chez la souris, que ce soit en vaccins protéiques ou géniques (cf. introduction partie IV.C.3). Malgré ces résultats prometteurs, peu d'études ont transposé cette approche dans des modèles grands mammifères. En l'occurrence, chez les ruminants, une seule étude a montré l'amélioration des réponses cellulaires IFN $\gamma$  chez le veau via DEC205 (Njongmeta et al., 2012). L'efficacité de la stratégie du ciblage des DCs dans un modèle ovin nous est donc parue pertinente à tester contre le vFVR et il serait intéressant d'approfondir les mécanismes de protection dans le modèle murin.

### a) Dans le modèle ovin

Nous avons montré pour la première fois l'amélioration de la réponse cellulaire IFN $\gamma$  par le ciblage des DCs via DEC205 dans un modèle ovin (article 1, Figure 3.B) et cette augmentation n'était pas liée à une surexpression du vecteur pscDEC-eGn par rapport peGn seul *in vivo* (article 1, Figure 2.E). Bien que la réponse humorale et la protection n'étaient pas améliorées par rapport à celles observées avec peGn contre le vFVR, ce type de stratégie pourrait être utilisé contre des pathogènes pour lequel la réponse cellulaire a un rôle important dans la clairance virale, notamment contre le virus de la grippe (Baranowska et al., 2015). En

revanche, l'adressage d'eGn vers le récepteur CD11c a montré des résultats contradictoires par rapport aux résultats obtenus dans un modèle murin contre un antigène tumoral (Wang et al., 2015). En effet, nous avons obtenu de manière globale une faible immunogénicité suite à la vaccination avec pscCD11c-eGn. A noter aussi que des différences d'immunogénicité ont été observées pour un même vecteur chez des moutons adultes et des agneaux (article 1, Figure 3 et Figure 14). L'âge et la race pourraient avoir influencé la réponse immunitaire.

De manière générale, les vecteurs pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn ont conféré une immunité différente ainsi qu'une protection plus faible par rapport à peGn et ces résultats peuvent être liés à plusieurs facteurs.

Premièrement, la vitesse d'internalisation de l'antigène adressé à la DC influence les réponses immunitaires induites. En effet, des études ont proposé qu'une présentation antigénique prolongée favoriserait la formation de lymphocytes Tfh dans les organes lymphoïdes secondaires, le développement de centres germinatifs et l'induction d'une réponse humorale robuste (Kato et al., 2015; Lahoud et al., 2011). Par ailleurs, la persistance plus longue de la protéine eGn non ciblée par rapport à l'eGn ciblée favoriserait l'interaction avec les LBs (Gudjonsson, 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que l'adressage d'eGn vers le récepteur DEC205 entrainerait une internalisation plus rapide par rapport à la protéine eGn seule et favoriserait la réponse cellulaire plutôt qu'umorale.

Deuxièmement, la différente distribution des récepteurs ciblés DEC205 et CD11c sur les leucocytes au sein d'une même espèce pourrait influencer la réponse immunitaire induite. (Geherin et al., 2012). Nous avons montré que les récepteurs DEC205 et CD11c étaient exprimés de façon indifférencié sur les cDC1 et les cDC2 issues de la lymphe ovine (article 1, Fig.1). D'autres études ont montré que DEC205 était également exprimé sur les lymphocytes du mouton, mais à un niveau plus faible par rapport aux DCs (Gliddon et al., 2004) et que le récepteur CD11c était exprimé sur les monocytes/macrophages (Bonneau et al., 2006) et les lymphocytes B (Geherin et al., 2012).

Troisièmement, les différents niveaux d'anticorps anti-eGn, les épitopes reconnus par ces anticorps et la nature des isotypes d'anticorps induits par nos vaccins pourraient expliquer les différences d'efficacité de protection observées. Nous avons constaté des signes cliniques plus graves et une virémie élevée chez les moutons immunisés par pscCD11c-eGn, groupe dans lequel une faible réponse humorale a été mesurée. A l'inverse, la meilleure protection a été observée dans le groupe immunisé par peGn qui présente la réponse humorale la plus forte.

La conformation de l'antigène eGn pourrait varier entre la forme libre et la forme fusionnée à un scFv. Ainsi, certains épitopes clés pour induire une cytotoxicité pourraient être masqués (He et al., 2016). Les anticorps anti-eGn générés par les vecteurs pscDEC-eGn et pscCD11c-eGn seraient moins efficaces pour exercer l'ADCC par rapport à ceux induits par peGn.

D'autre part, la nature des anticorps anti-eGn induits par nos vecteurs pourraient être différente et auraient ainsi une efficacité différente à induire la cytotoxicité. Le mécanisme d'action des anticorps dépend de l'affinité du domaine Fc des IgG avec les récepteurs Fc $\gamma$ R sur des cellules effectrices. Chez la souris, les isotypes IgG2a et IgG2b sont plus efficaces pour médier la cytotoxicité (Nimmerjahn and Ravetch, 2005), tandis que chez l'Homme, ce sont plutôt les IgG1 et les IgG3 (Irani et al., 2015). Dans la limite des outils disponibles, nous n'avons pas pu répondre à ces questions qui restent à être éclaircir.

Enfin, les niveaux et la durée d'expression des plasmides peuvent varier *in vivo* et peuvent impacter l'immunogénicité.

#### b) Dans le modèle murin

La stratégie de ciblage des DCs via DEC205 a induit des réponses immunes différentes chez le mouton et la souris. Chez le mouton, la réponse IFN $\gamma$  était améliorée. Au contraire, chez la souris, les réponses IFN $\gamma$  et humorales étaient réduites (article 2, Figure 4). Ces résultats montrent les limites du modèle murin qui n'est pas forcément prédictif sur les réponses immunes chez le mouton.

Parmi les nombreuses études ayant montré l'efficacité du ciblage des DCs chez la souris, une seule étude a rapporté une réduction de la réponse IFN $\gamma$  chez des souris immunisées par un plasmide codant l'hémagglutinine et délivré par électroporation. Cette faible immunogénicité était associée à l'induction de lymphocytes T régulateurs (Tregs) dans les ganglions lymphatiques (Niezold et al., 2015). Bien que les raisons ne soient pas très claires, il semblerait que certaines conditions favoriseraient la mise en place d'une réponse tolérogène plutôt qu'effectrice.

De nombreux travaux ont montré l'effet adjuvant d'un plasmide codant le GM-CSF (Saade and Petrovsky, 2012). Pourtant, une étude a montré que la délivrance d'un plasmide codant le GM-CSF dans la peau a induit le recrutement de DCs semi-matures (Matthews et al., 2007)

favorables à l'induction de Tregs (Gaudreau et al., 2007). De plus, la dose de GM-CSF semble déterminer son effet sur la réduction de la réponse immune. L'injection d'une haute dose de GM-CSF chez le singe par un vecteur virus de la vaccine exprimant le GM-CSF (MVA-GM-CSF) a fortement réduit la réponse humorale (Kannanganat et al., 2016).

Dans notre étude, nous avons émis l'hypothèse que l'expression d'une forte dose de GM-CSF chez la souris dans nos conditions d'immunisation aurait favorisé l'induction de Tregs. Cependant, la présence ou l'absence de l'adjuvant GM-CSF n'a pas amélioré l'immunogénicité médiée par pscDEC-eGn (article 2, Fig. 3). Au contraire, en ce qui concerne les plasmides codant l'eGn non ciblé (peGn et pscCtrl-eGn), le plasmide codant le GM-CSF a eu un effet adjuvant sur la réponse cellulaire. Il est possible que l'expression prolongée de pscDEC-eGn, au-delà de l'inflammation locale induite par l'électroporation, permette la fixation du scDEC-eGn sur les DCs semi-matures et favorise l'induction de Tregs. Nous n'avons mesuré ni d'augmentation de lymphocytes Tregs totaux dans la rate, ni celle de lymphocytes T sécréteurs d'IL-10 induite par le GM-CSF et/ou le ciblage des DCs via DEC205. Toutefois, nous n'avons pas évalué ce paramètre dans les ganglions et cette augmentation possible des Tregs dans ce compartiment pourrait expliquer la réduction des réponses IFN $\gamma$  et humorales observées. Aussi, nous n'avons pas mesuré les Tregs spécifiques de l'antigène vaccinal. Nous pourrions spéculer que chez le mouton l'expression du pscDEC-eGn serait moins longue que chez la souris, scDEC-eGn aurait alors ciblé des DCs activées par la vaccination et non pas des DCs semi-matures et elle aurait ainsi favorisé l'induction d'une réponse effectrice. Chez la souris, l'expression plus longue du plasmide aurait conduit au ciblage de DCs semi-matures, favorisant l'apparition des Tregs.

L'adressage de mCherry vers DEC205 en présence ou en l'absence d'adjuvant génique pGM-CSF a induit une forte réponse humorale, d'ailleurs améliorée en l'absence d'adjuvant. Ces résultats diffèrent de ceux qui ont été obtenus avec le ciblage eGn (article 2, Figure 5.B). L'efficacité du ciblage des DCs en vaccination à ADN semble dépendre également de l'antigène fusionné au scFv qui pourrait affecter l'endocytose du complexe et impacter la réponse humorale ou cellulaire.

### c) Perspectives

Nous avons montré que les résultats de la stratégie de ciblage DCs chez la souris en vaccination à ADN n'étaient pas prédictifs de ceux obtenus dans un modèle grand mammifère et dépendaient de l'antigène ainsi que de l'espèce testés. Bien qu'une étude ait essayé d'investiguer les paramètres clés associés à une présentation antigénique efficace suite au ciblage des DCs *in vitro*, ils restent encore inconnus à ce jour (Reuter et al., 2015). Les paramètres capables d'influencer la présentation antigénique dans le cadre de la stratégie de ciblage des DCs, tels que le récepteur ciblé, l'adjuvant utilisé, le routage intracellulaire de l'antigène d'intérêt, la persistance de la présentation antigénique dans les organes lymphoïdes secondaires *in vivo*, doivent être d'avantage investigués pour améliorer l'efficacité de la stratégie de ciblage des DCs.

Nous avons montré que peGn induisait une protection incomplète et que la réponse humorale était importante dans la protection contre le vFVR chez le mouton. Le ciblage des DCs via les récepteurs CLEC9A (Lahoud et al., 2011; Park et al., 2017) et XCR1 (Fossum et al., 2015), connus pour améliorer la réponse humorale chez la souris, pourrait être évalué chez le mouton pour renforcer la protection. Par ailleurs, un projet coordonné par notre équipe de l'INRA et dans lequel j'ai participé (pour l'analyse des réponses cellulaires), a montré que le ciblage des DCs via XCR1 contre le virus de la grippe par l'utilisation d'un vaccibody, formé de l'XCL1 porcine et de l'ectodomaine de la protéine de la matrice M2 du virus, en l'absence d'adjuvant améliore la réponse humorale chez le porc (Annexe 2). Le ciblage des DCs via le récepteur XCR1 pourrait être un candidat pertinent dans le cadre de la vaccination contre le vFVR.

Le ciblage des DCs via DEC205 en vaccination protéique sans adjuvant induit une réponse tolérogène et semble être une approche intéressante contre des maladies inflammatoires (Ring et al., 2017; Spiering et al., 2017). En vaccination à ADN, il serait également possible d'induire des réponses tolérogènes. Cette stratégie peut être envisagée contre ce type de pathologie, bien que les paramètres gouvernant l'induction d'une réponse tolérogène ne soient pas maîtrisés en vaccination ADN et restent à être déterminés.

### 3. L'étude des réponses immunes impliquées dans la protection médiée par peGn chez la souris

#### a) La contribution des réponses humorales et cellulaires

Parmi nos candidats vaccinaux, la meilleure protection a été obtenue avec peGn chez le mouton et les analyses de corrélations ont mis en évidence une forte relation entre le niveau d'anticorps anti-eGn dans les sérums et la réduction de la virémie et celle des signes cliniques. Pour valider cette hypothèse, nous avons évalué le rôle de la réponse humorale et des lymphocytes T dans la protection médiée par peGn dans le modèle murin. Le choix s'est porté sur ce modèle car les souris sont sensibles à l'infection par le vFVR, elles développent des symptômes similaires à ceux observés chez l'Homme infecté (Smith et al., 2010) et enfin pour des raisons pratiques (nombre d'animaux, taille, lignée consanguine).

Nous avons tout d'abord confirmé l'immunogénicité de peGn chez la souris. En présence d'adjuvant pGM-CSF, le vecteur peGn a induit une réponse humorale et également une réponse IFN $\gamma$  (article 2, Figure 2.A). De façon similaire aux résultats obtenus chez le mouton, ce plasmide induit des anticorps anti-eGn non neutralisants *in vitro*.

Nous avons réalisé un transfert passif et adoptif de sérum et de lymphocytes T purifiés sur colonne, issus de souris non immunisées (PBS + pGM-CSF) et immunisées (peGn + pGM-CSF) dans des souris naïves. Après une infection expérimentale, nous avons confirmé le rôle majeur du sérum contenant les anticorps anti-eGn par rapport aux lymphocytes T. Les souris ayant reçu du sérum de souris vaccinées étaient mieux protégées (75% de survie) par rapport aux souris qui ont reçu du sérum de souris non vaccinées (0% de survie). Les souris ayant reçu des lymphocytes T de souris vaccinées ou contrôles n'étaient pas protégées (20% et 40% de survie respectivement). Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-eGn, bien qu'ils soient non neutralisants *in vitro*, seraient importants pour la protection. Nos résultats confirment le rôle de la réponse humorale dans la protection médiée par un plasmide codant l'eGn qui a été mis en évidence dans une étude antérieure chez la souris (Bhardwaj et al., 2010). En revanche, nous avons apporté une information supplémentaire quant à l'absence probable du rôle des lymphocytes T induit par peGn contre le vFVR et qui n'avait pas été évalué jusqu'à présent. Toutefois, nous n'avons peut-être pas transféré suffisamment de lymphocytes T cytotoxiques pour obtenir une protection. De plus, bien que nous ayons trié négativement les lymphocytes T pour éviter leur activation, il n'est pas exclu que le stress cellulaire induit par l'extraction, l'isolement et le transfert aient affecté leur fonction.

## b) La caractérisation des anticorps anti-eGn : la séro-neutralisation

Classiquement, le test de séroneutralisation est réalisé sur des cellules Vero. Dans nos deux modèles d'études, les vaccins à ADN ont induit la production d'anticorps anti-eGn non neutralisants *in vitro*. Cependant, cette propriété, mise en évidence *in vitro*, ne reflète peut-être pas leur capacité à neutraliser les particules virales *in vivo* étant donné que certains récepteurs cellulaires identifiés dans l'attachement viral ne sont pas exprimés sur les cellules Vero (DC-SIGN, L-SIGN). En effet, une étude a mis en évidence une différence de titres d'anticorps neutralisants médiés par des anticorps polyclonaux issus de sérums prélevés chez des patients vaccinés contre le virus du West Nile selon le type de cellules employées, en particulier entre des cellules Vero et des Raji exprimant le récepteur DC-SIGN impliqué dans l'attachement viral des flavivirus (Mukherjee et al., 2014).

## c) Perspectives

Bien que nous ayons confirmé le rôle de la réponse humorale médiée par peGn chez la souris, le mécanisme d'action reste à être étudié. Nous avons émis l'hypothèse que les anticorps anti-eGn non neutralisants protègent contre l'infection par le vFVR, entre autre par ADCC. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait d'abord valider leur rôle grâce à un transfert d'anticorps anti-eGn purifiés dans des souris naïves et tester leur protection. Dans un second temps, un transfert d'anticorps anti-eGn purifiés dans des souris naïves déficientes pour le récepteur FcR $\gamma$  nous permettrait de mieux comprendre le mécanisme d'action médiée par ces anticorps contre le vFVR. La validation du rôle protecteur des anticorps anti-eGn est primordiale pour consolider le corrélat de protection et ainsi permettre le développement de futurs vaccins efficaces contre le vFVR. Il serait également intéressant d'évaluer la neutralisation des anticorps anti-eGn sur d'autres types cellulaires, en particulier les cellules neuronales, hépatiques et dendritiques/macrophages qui sont les cellules cibles du virus *in vivo*, pour CLEC9A CLEC9A déterminer au mieux leurs propriétés.

## VIII. Conclusion

La vaccination à ADN a montré des résultats prometteurs chez la souris contre divers pathogènes mais s'est révélée peu immunogène dans les modèles grands mammifères. Lors de mon travail de thèse nous avons établi une vaccination optimisée en co-injectant le plasmide codant l'antigène d'intérêt avec un adjuvant génique, délivré par une électroporation de surface, et nous avons adressé l'antigène vers des récepteurs exprimés à la surface des DCs connus pour être impliqués dans une présentation antigénique efficace.

Nous avons montré qu'un vaccin à ADN codant l'eGn en présence d'adjuvant génique délivré par électroporation induisait une forte production d'anticorps non neutralisants et pouvait conférer une protection contre le vFVR chez le mouton. Les analyses de corrélation ont indiqué que les réponses humorales anti-eGn étaient associées à la protection chez le mouton et nous avons confirmé leur rôle protecteur par un transfert passif chez la souris. Les mécanismes d'actions de ces anticorps non neutralisants *in vitro* restent à être déterminés.

En revanche, nous avons montré que la stratégie de ciblage des DCs n'améliorait pas l'efficacité d'un vaccin à ADN contre le vFVR et que l'effet de cette stratégie sur la réponse immune était difficilement transposable entre espèces. Chez le mouton, bien que l'adressage de l'antigène eGn vers DEC205 ait amélioré la réponse cellulaire IFN $\gamma$ , la protection était réduite par rapport à celle induite par l'eGn non ciblée. Au contraire chez la souris, les réponses IFN $\gamma$  et humorales induites par l'eGn ciblée vers DEC205 étaient inhibées. De plus l'effet du ciblage de DEC205 sur la réponse immune s'est révélé dépendre de l'antigène fusionné. Les mécanismes impliqués dans l'efficacité du ciblage des DCs doivent être davantage explorés pour améliorer cette stratégie vaccinale.